

答弁書

特許庁審査官殿

1. 国際出願の表示

PCT/J P 0 3 / 0 5 0 2 4

2. 出願人

名 称 塩野義製薬株式会社

SHIONOGI & CO., LTD.

あて名 〒541-0045

日本国大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番地8号

1-8, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,

Osaka 541-0045 Japan

国 籍 日本国 Japan

住 所 日本国 Japan

3. 代理人

氏 名 (7828) 弁理士 山本 秀策

YAMAMOTO Shusaku

あて名 〒540-6015 日本国大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

Fifteenth Floor, Crystal Tower, 2-27, Shiromi 1-chome,

Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 540-6015 Japan

4. 通知の日付 09. 09. 03

5. 答弁の内容

見解書の第V欄[19]に記載された見解に対し、以下のように答弁いたします。

(1) 本願発明の特徴

本願請求の範囲第4項に記載の化合物は、「5位が置換カルバモイル基であり、7位は水素、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ハロゲンまたは置換されていてもよいアミノであるピラゾロ[1, 5-a]ピリミジンである」との構造上

の特徴を有します。中でも特に、「ピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジンの5位に置換カルバモイル基を導入する」ことにより、好中球および血管内の強力なNAD(P)Hオキシダーゼ阻害作用が得られ、この阻害作用によって活性酸素(ROS、スーパーオキシド)産生を抑制でき、種々の循環障害および胃粘膜障害を治療または予防することができます。このような効果は、従来技術からは予測することのできなかった格別の効果です。

(2) 引用文献の内容

2.1 文献23および24は、7位がメチル基であり、5位が置換カルバモイル基であるピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジンを記載します。

2.2 文献1~22および文献25は、炎症、動脈硬化、高血圧症等の治療または予防に有用であるピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジンを記載します。

(3) 本願発明(請求の範囲第4項およびその従属項)と引用文献との対比

3.1 新規性に関して

上記(1)でご説明致しましたように、本願請求の範囲第4項に記載の発明は、「5位が置換カルバモイル基であり、7位は水素、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ハロゲンまたは置換されていてもよいアミノであるピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジン」に関します。しかしながら、文献23および24は、「7位がメチル基であるピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジン」を開示しており、上記特徴を有する本願請求の範囲第4項に記載の化合物とは、異なります。

従いまして、少なくとも本願請求の範囲第4項およびその従属項に記載の発明は、文献23および24に対して、新規性を有します。

3.2 進歩性に関して

文献1~22および25は、炎症、動脈硬化、高血圧症等の治療または予防に有用であるピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジン化合物を記載しますが、NAD(P)Hオキシダーゼ阻害について、何ら教示しておりません。

また、文献1~22および25はいずれも、本願請求の範囲第4項に記載の発

明の特徴を有する化合物、つまり、「5位が置換カルバモイル基であるピラゾロ[1, 5-a]ピリミジン」を開示も示唆もしておりません。

これに対して、本願発明では、NAD(P)Hオキシダーゼ阻害作用が強い化合物について探索を進め、本願請求の範囲第4項に記載の化合物に至りました。すなわち、文献1～22および25とは異なる機能（つまり、NAD(P)Hオキシダーゼ阻害作用）について研究を行ったから本願請求の範囲第4項に記載の発明に至ったのであり、文献1～22および25に記載の機能に基づいて研究を行っても、本願請求の範囲第4項に記載の発明に至るとは到底いえません。

また、文献1～22および25は、ピラゾロ[1, 5-a]ピリミジンの5位に置換カルバモイル基を導入することにより、炎症、動脈硬化、高血圧症等の治療または予防において特に有用であるとの効果が得られることについて、教示も示唆もしておりません。

文献23および24は、5位が置換カルバモイル基であるピラゾロ[1, 5-a]ピリミジンを開示しますが、単なる合成法を開示しているに過ぎず、ピラゾロ[1, 5-a]ピリミジンの5位に置換カルバモイル基を導入することにより、炎症、動脈硬化、高血圧症等の治療または予防において特に有用であるとの効果が得られることについて、教示も示唆もしておりません。

従いまして、文献1～22および25の開示と、文献23および24の開示とをどのように組み合わせたとしても、当業者は、炎症、動脈硬化、高血圧症等の治療または予防において特に有用であるとの効果を得るために、5位に置換カルバモイル基を導入するという発想には到底いたりません。

本願発明によれば、「ピラゾロ[1, 5-a]ピリミジンの5位に置換カルバモイル基を導入する」ことにより、血管平滑筋細胞由来及び好中球（多核白血球）由来のNADPHオキシダーゼの強力な阻害活性を得ることができます。この点に関して、本願発明の代表的化合物のNADHオキシダーゼ阻害活性試験お

よびその結果を甲第1号証として提出いたします。なお、甲第1号証の表1に示した化合物の番号1～23はそれぞれ、本願明細書の表1または表2に記載のA-126、A-148、A-362、A-363、B-336、B-5、B-6、B-9、B-17、B-30、A-348、B-251、B-195、B-258、B-196、A-141、A-193、A-325、B-96、B-153、B-188、B-195の $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 塩およびB-195の $0.9\text{HClO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 塩に該当します。

甲第1号証によれば、①カルバモイルが置換されている化合物（6～23）とそれ以外の化合物（1～5）とを比較することにより、カルバモイルが置換されている化合物（6～23）は血管平滑筋細胞由来及び多核白血球由来のNADHオキシダーゼの阻害活性が強いことが明かです。また、②カルバモイル置換体において、6位置換体（6～10）と5位置換体（11～15）とを比較することにより（なお、それぞれの置換体の5位及び6位以外は、同じ置換基である）、後者の方が多核白血球由来のNADHオキシダーゼについて、高い活性を示していることが明かです。また、その他の5位置換体（16～23）についても同様の傾向が見られることから、5位置換体は多核白血球由来のNADHオキシダーゼについても阻害活性が強力であると言えます。また、6位置換体と5位置換体の多核白血球由来のNADHオキシダーゼに対する阻害活性の差は、100倍以上のものもあり、5位置換体は顕著な効果を有しているといえます。

上述の通り、ピラゾロピリミジン誘導体の中でもカルバモイル体が血管平滑筋細胞由来の細胞が産生するNADHオキシダーゼに対する阻害活性が強力であるため、該NADHオキシダーゼが原因となる動脈硬化症や高血圧（背景技術参照）については、本願発明化合物は有用であるといえます。なお、ピラゾロピリミジン誘導体が動脈硬化症および高血圧の治療効果を有することは、文献18～20に記載されていますが、これらの文献に記載されている化合物は、カルバモイル体ではありません。

また、5位カルバモイル置換体は6位カルバモイル置換体と比較して、多核白血球が産生するNADHオキシダーゼに対して強力な阻害作用があることから、

該酵素が病態の原因となる炎症や脳梗塞（背景技術参照）の治療において、本願請求の範囲第4項記載の5位カルバモイル置換体は、非常に有効であると言えます。なお、ピラゾロピリミジン誘導体が炎症や脳梗塞の治療効果を有することは、文献2、9、12、13、17に記載されていますが、これらの文献に記載されているのは、6位カルバモイル体であり、5位カルバモイル体ではありません。

甲第2号証（日本臨床60巻増刊号10（2002）第183～184頁）の第184頁の記載にある通り、糖尿病患者においては多核白血球の活性酸素産生能は亢進しているという報告があることから、多核白血球の活性酸素を産生する原因となるNADHオキシダーゼを強力に阻害する請求項第4項記載の5位カルバモイル置換体は非常に有効であり、糖尿病網膜症などの合併症にも有効であるといえます。一方、文献10記載のピラゾロピリミジン誘導体は糖尿病に治療効果を有しますが、6位カルバモイル置換体であり5位カルバモイル置換体ではありません。

このように、本願発明の上記特徴の中でも特に、「ピラゾロ〔1, 5-a〕ピリミジンの5位に置換カルバモイル基を導入する」ことにより、「好中球および血管内の強力なNAD（P）Hオキシダーゼ阻害作用が得られ、この阻害作用によって活性酸素（ROS、スーパーオキシド）産生を抑制でき、種々の循環障害および胃粘膜障害を治療または予防することができる」との効果は、いずれの引用文献からも当業者が予測することのできなかつた驚くべき結果です。

従いまして、少なくとも本願請求の範囲第4項およびその従属項に記載の発明は、引用文献1～25に対して進歩性を有します。

（証拠方法）

甲第1号証 本願発明の代表的化合物のNADHオキシダーゼ阻害活性試験およびその結果

甲第2号証 日本臨床60巻増刊号10（2002）第183～184頁

6. 添付書類の目録

(1) 甲第1号証

1 通

(2) 甲第2号証

1 通

以上

本願発明の代表的化合物のNADHオキシダーゼ阻害活性試験

およびその結果

1. 目的

本願請求の範囲第4項に規定される「5位に置換カルバモイル基を導入したピラゾロ[1, 5-a]ピリミジン」の代表的化合物について、インビトロでのNADHオキシダーゼ阻害活性を調べること。

2. 試験化合物

本試験に用いた本願発明の代表的化合物の番号1～23(表1)はそれぞれ、本願明細書の表1または表2に記載のA-126、A-148、A-362、A-363、B-336、B-5、B-6、B-9、B-17、B-30、A-348、B-251、B-195、B-258、B-196、A-141、A-193、A-325、B-96、B-153、B-188、B-195の $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 塩およびB-195の $0.9\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ 塩に該当する。

3. 試験方法

本願発明の代表的化合物について、1)血管平滑筋細胞由来、及び2)好中球(多核白血球)由来のNADHオキシダーゼの阻害活性をインビトロで調べた。

3.1 上記1)血管平滑筋細胞由来のNADHオキシダーゼ阻害活性試験は、本願実施例2.1に記載の方法と同様の方法を用いて行った。

3.2 上記2)好中球(多核白血球)由来のNADHオキシダーゼの阻害活性試験は、以下の方法により行った。

(1. ラット好中球の調整)

雄性Wistarラットの腹腔内に、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解した2%カゼインを120ml/kg注入する。16～18時間後にエーテル麻酔下で放血致死後、腹腔内を氷冷したPBSで腹腔内に遊走した好中球を回収した。好

中球を遠心分離後、一部を Turk 液で染色、好中球の数と割合を算出し、 5×10^6 個/ml に P B S で調整した。

(2. 好中球 NADH オキシダーゼ阻害活性の測定)

好中球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激することで活性化される NADPH オキシダーゼによって生ずる O_2^- を lucigenin による化学発光を定量することで算出した。すなわち、 $250 \mu M$ lucigenin および $0.7 \mu M$ PMA を含む P B S に好中球 10^6 個、ジメチルスルホキシドに溶解した本願発明の化合物を添加して $37^\circ C$ で反応させた。酵素反応によって放出される O_2^- が Lucigenin を励起することで生じる化学発光をルミネッセンスリーダーで検出し、酵素活性として定量した。

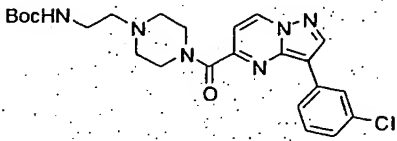
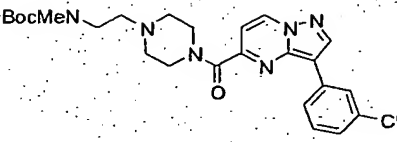
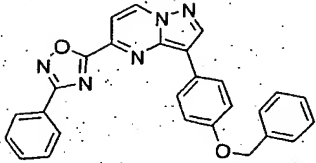
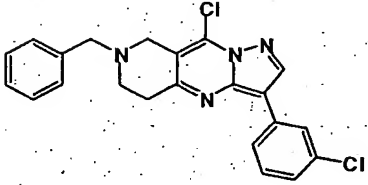
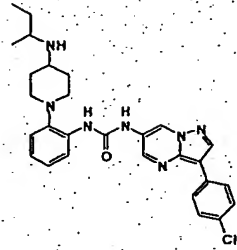
4. 試験結果

本願実施例の代表的化合物の NADH o x i d a s e IC_{50} を添付の表 1 に示す。表 1 より、以下の二点を明らかにした。

4.1 カルバモイルが置換されている化合物 (番号 6 ~ 23) とそれ以外の化合物 (番号 1 ~ 5) を比較した場合、カルバモイルが置換されている化合物 (番号 6 ~ 23) は血管平滑筋細胞由来及び好中球 (多核白血球) 由来の NADH オキシダーゼの阻害活性が強いことがわかる。

4.2 カルバモイル置換体において、6 位置換体 (番号 6 ~ 10) と 5 位置換体 (番号 11 ~ 15) を比較した場合 (それぞれ、5 位及び 6 位以外は、同じ置換基である)、後者の方が多核白血球由来の NADH オキシダーゼについて、高い活性を示している。また、その他の 5 位置換体 (番号 16 ~ 23) についても同様の傾向が見られることから、5 位置換体は多核白血球由来の NADPH オキシダーゼについても阻害活性が強力であると言える。また、6 位置換体と 5 位置換体の多核白血球由来の NADH オキシダーゼに対する阻害活性の差は、1.0.0 倍以上のものもあり、5 位置換体は顕著な効果を有しているといえる。

表1. 本願実施例の代表的化合物のNADHoxidase IC50

番号	化学式	血管平滑筋細胞由来 NADH oxidase IC ₅₀	好中球(多核白血球)由来 NADH oxidase IC ₅₀
1		8.10	0.25
2		2.65	1.19
3		1.76	5.75
4		2.92	1.59
5		1.13	2.56

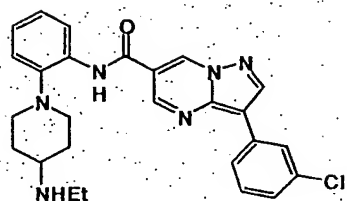
番号

化学式

血管平滑筋細胞由来
NADH oxidase IC50

好中球(多核白血球)由来
NADH oxidase IC50

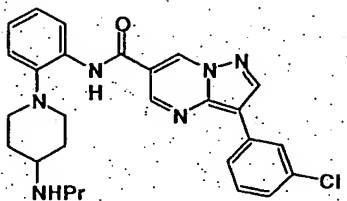
6



0.90

2.69

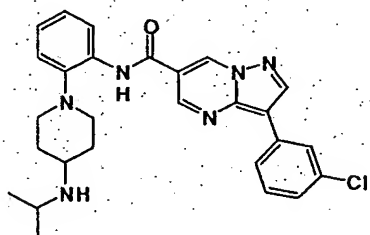
7



0.45

1.71

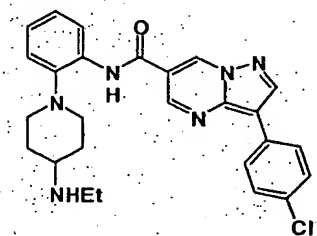
8



0.50

2.13

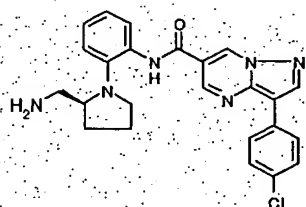
9



0.80

1.51

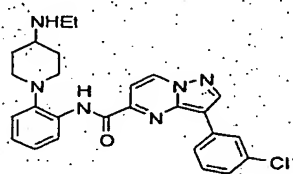
10



1.917

4.38

11



0.13

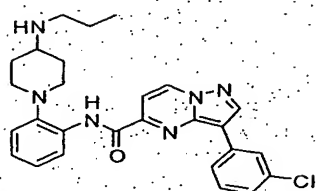
0.01

番号

化学式

血管平滑筋細胞由来
NADH oxidase IC50好中球(多核白血球)由来
NADH oxidase IC50

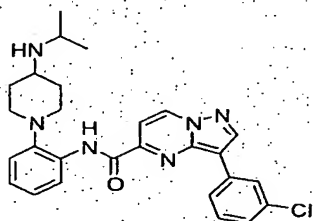
12



0.44

0.02

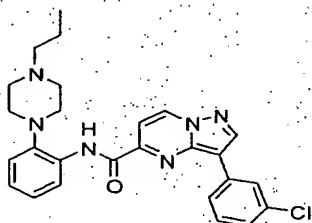
13



0.32

0.06

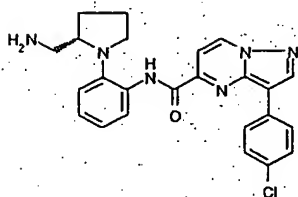
14



0.77

0.17

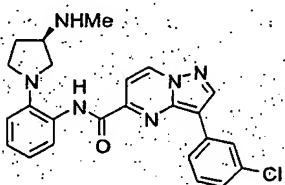
15



0.537

0.07

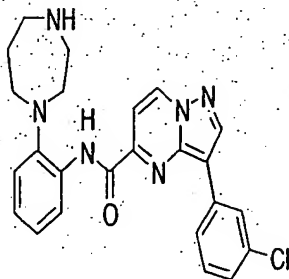
16



0.36

0.05

17



0.45

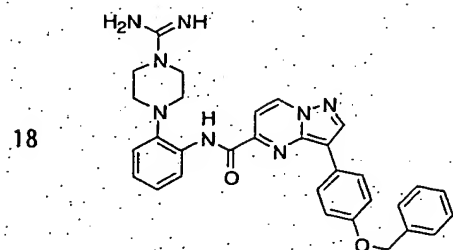
0.08

番号

化学式

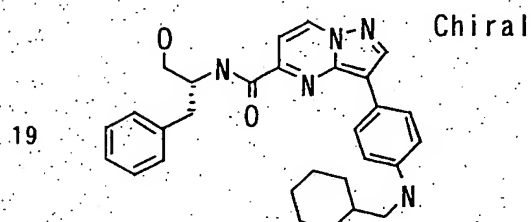
血管平滑筋細胞由来
NADH oxidase IC50

好中球(多核白血球)由来
NADH oxidase IC50



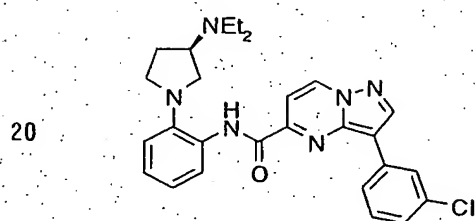
0.25

0.08



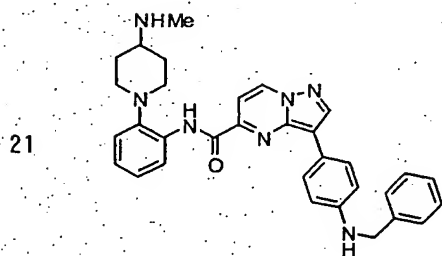
0.516

0.08



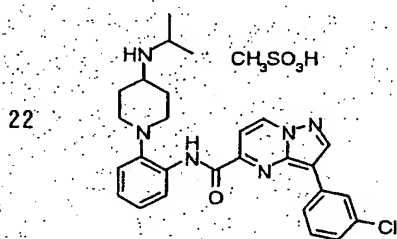
0.709

0.06



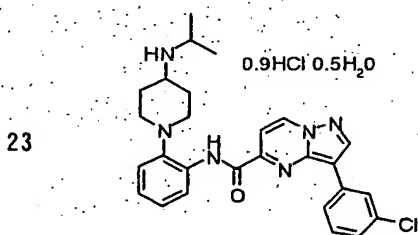
0.210

0.05



0.561

0.06



0.470

0.04

糖尿病性網膜症と白血球

慢性合併症

糖尿病性網膜症と白血球

—網膜症に対する抗白血球捕捉療法の可能性—

Diabetic retinopathy and leukocytes

—Feasibility of anti-leukostasis therapy for diabetic retinopathy—

宮本和明¹⁾ 小椋祐一郎²⁾

key words : 糖尿病性網膜症, 白血球, 毛細血管閉塞, 血管透過性亢進, 抗白血球捕捉療法

はじめに

糖尿病性網膜症(以下網膜症と略す)は、血管閉塞による虚血性変化から血管新生を主体とする増殖病変を形成する点に特徴がある。虚血性変化が病変の主体となるのは単純網膜症の時期であり、この時期には2つの重要な初期病変、すなわち微小血管閉塞と血管透過性亢進がみられるが、その発症機序に関してはいまだに不明な点が多い。

一方、虚血再灌流障害やショック、動脈硬化といった循環器系の疾患の病態形成に、白血球が重要な役割を果たしていることが指摘されている。白血球は、形態学的特殊性により微小血管を、抗微生物作用に基づく細胞毒性により血管内皮障害をもたらし得るからである。網膜症は微小血管の関与する血管病であり、上述の理由から、その初期病変の発症原因として白血球が注目されるようになってきた¹⁾。

本稿では、網膜症の病態形成における白血球の役割について概説し、その作用を抑制することによる網膜症発症予防の可能性について述べる。

1. 微小循環における白血球の意義

白血球は他の血球成分にはない特殊な性質をもつ。その特殊な性質の一つは、大きな細胞容積と硬い細胞質といった形態学的特性である。白血球の直径は毛細血管の直径より大きく、白血球が毛細血管を通過する際には必ず変形を要す。更に赤血球の1,000-10,000倍といわれている硬い細胞質のために、白血球は、血球成分の構成比では0.1%にすぎないのに、全血の循環抵抗の約20%を生み出している。よってひとたび、血管側の要因として血液循環の低下や毛細血管抵抗の増加、白血球側の要因として変形能の低下や血管壁への粘着性の亢進が生じれば、白血球は毛細血管を通過しにくくなり、微小循環障害の原因となり得る。

またもう一つの特殊な性質は、血管内皮への粘着性と活性酸素や蛋白分解酵素、サイトカインなどの産生能といった生理学的特性である。これらの特性は本来、外来異物処理のためのものであるが、過剰に反応した場合や何らかの原因で白血球の活性化異常が生じれば、正常組織に対する細胞障害につながる。微小循環においては、血管内皮細胞障害や血管透過性亢進の原因

¹⁾Kazuaki Miyamoto: Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto University Medical School, Yushiro Ogura: Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School, 名古屋大学医学部眼科

表 1 糖尿病における白血球異常

1. 変形能の低下
a. 細胞膜流動性の低下
b. 白血球表面への血漿蛋白の吸着増加
2. 活性化の亢進
a. 無刺激時の活性酸素産生能の亢進
b. 刺激時の活性酸素産生能の亢進
3. 粘着能の亢進
a. インテグリン(CD11a, CD11b, CD18)の発現亢進
b. 糖化酵素 core 2 transference の活性亢進

因となる可能性があり、実際、出血性ショックや心筋の虚血再灌流障害において、白血球が不可逆的な毛細血管の閉塞と血管内皮障害をもたらし、心筋の虚血が報告されている。また、心筋の虚血再灌流障害では、生体から白血球を除去してやると心筋の障害の程度が軽くなるという事実も報告されている。このように白血球は、微小循環に対して大きな影響力をもち、微小循環の障害と関係する疾患の病態形成に深く関与しているといえる。

2. 糖尿病における白血球異常

糖尿病状態になると、白血球に様々な異常が生じることが報告されている(表1)。まず最初にあげられるのが、変形能の低下である。糖尿病状態では、白血球細胞膜の流動性が低下し、血漿蛋白の白血球表面への吸着が増加するため、白血球変形能は低下する。毛細血管を模したマイクロチャネルと呼ばれる微小管路に血液を流し、血液成分のレオロジーを評価する細胞マイクロレオロジー測定装置を用いて、糖尿病患者の血液レオロジーを検討したところ、糖尿病患者の白血球に変形能低下があり、糖尿病白血球が微小管路を閉塞することによって、血液通過時間の延長をもたらし、微小循環障害を生じ得ることがわかった(図1)。

2番目の糖尿病における白血球異常として、活性化の亢進があげられる。糖尿病患者において、無刺激時の多核白血球の活性酸素産生能は亢進しており、刺激時においても、糖尿病患者および糖尿病モデルネコの多核白血球は、対照

に比べより多くの活性酸素を産生する。また、糖尿病モデルラットの循環血液中には、活性化された単核球や顆粒球の数が増加していると報告されている²⁾。このような活性化の亢進は、白血球の細胞障害性を高め、一方で細胞骨格の変化により白血球の変形能を更に低下させることになる。

3番目の白血球異常として、粘着能の亢進があげられる。白血球は、高血糖状態になると、血管内皮に接着しやすくなるとされている。そこで著者は、ウェルに内皮を培養し、そこに

蛍光標識した白血球を接触させ、その蛍光強度を測定することで白血球の内皮への粘着能を評価する adhesion assay 法を用いて、糖尿病ラットの白血球の粘着能を検討した。糖尿病白血球の内皮への粘着能は、対照に比べ約1.8倍亢進していた³⁾。また、白血球が血管内皮に接着する際、細胞接着分子と呼ばれる細胞表面機能分子を介することが知られているが、糖尿病ではこの細胞接着分子の発現が亢進する。白血球の血管内皮への強固な接着に關与するインテグリンと呼ばれる細胞接着分子の発現が、網膜症を有する糖尿病患者で亢進していると報告されている⁴⁾。著者は、糖尿病白血球のインテグリンの発現について、フローサイトメトリー法を用いて検討したところ、CD11a, CD11b, CD18の発現亢進が認められた⁵⁾。これらのインテグリンのうち、どのインテグリンが糖尿病白血球の内皮粘着亢進に關与しているかを調べるために、抗インテグリン抗体を用いて検討したところ、抗CD11a抗体に粘着抑制効果はなかったが、抗CD11b抗体および抗CD18抗体に有意な粘着抑制効果がみられた⁶⁾。以上の結果から、糖尿病白血球の血管内皮への粘着亢進の一部にCD11bとCD18のヘテロダイマーであるMac-1の関与が示唆された。

また最近では、糖化酵素である core 2 transference の活性が糖尿病白血球で亢進しており、それが白血球表面の細胞接着分子の発現を変化させることで、血管内皮への粘着を促進すると報告もある⁷⁾。

以上のような白血球異常は、特に微小血管に

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.